

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2003年10月2日 (02.10.2003)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 03/080670 A1

(51) 国際特許分類: C07K 16/18, C12P 21/08,
C12N 5/08, 5/18, 15/09, A61L 27/00

(21) 国際出願番号: PCT/JP03/03624

(22) 国際出願日: 2003年3月25日 (25.03.2003)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願2002-84280 2002年3月25日 (25.03.2002) JP

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 科学技術
振興事業団 (JAPAN SCIENCE AND TECHNOLOGY
CORPORATION) [JP/JP]; 〒332-0012 埼玉県 川口市
本町4丁目1番8号 Saitama (JP). 財団法人ひろし
ま産業振興機構 (HIROSHIMA INDUSTRIAL PRO-
MOTION ORGANIZATION) [JP/JP]; 〒730-0052 広島
県 広島市 中区千田町3丁目7番47号 Hiroshima
(JP).

(72) 発明者: および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 向谷 知世

(MUKAIDANI, Chise) [JP/JP]; 〒739-0024 広島県 東広
島市 西条町御園宇6091-11 Hiroshima (JP). 吉里
勝利 (YOSHIZATO, Katsutoshi) [JP/JP]; 〒739-0144 広
島県 東広島市 八本松南7-22-13 Hiroshima (JP).
山崎 ちひろ (YAMASAKI, Chihiro) [JP/JP]; 〒739-0025
広島県 東広島市 西条中央4-4-34-303 Hi-
roshima (JP).

(74) 代理人: 西澤 利夫 (NISHIZAWA, Toshio); 〒150-0042
東京都 渋谷区 宇田川町37-10 麻仁ビル6階
Tokyo (JP).

(81) 指定国 (国内): CA, CN, JP, SG, US.

(84) 指定国 (広域): ヨーロッパ特許 (AT, BE, BG, CH, CY,
CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC,
NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR).

添付公開書類:
— 国際調査報告書

2文字コード及び他の略語については、定期発行される
各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語
のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: ANTIBODY RECOGNIZING PROLIFERATIVE HUMAN LIVER CELLS, PROLIFERATIVE HUMAN LIVER CELLS AND FUNCTIONAL HUMAN LIVER CELLS

(54) 発明の名称: 増殖性ヒト肝細胞を認識する抗体と、増殖性ヒト肝細胞および機能性ヒト肝細胞

(57) Abstract: It is intended to provide a monoclonal antibody which specifically recognizes human liver cells proliferating while forming colonies, a method of separating proliferative human liver cells with the use of this antibody, and a method of inducing the differentiation of the proliferative human liver cells thus separated into functional human liver cells. It is also intended to provide the proliferative human liver cells and the functional human liver cells obtained by the above methods, and a cell kit and a hybrid type artificial human liver containing these cells.

(57) 要約: この出願の発明は、コロニーを形成しながら増殖するヒト肝細胞を特異的に認識するモノクローナル抗体と、この抗体を用いて増殖性ヒト肝細胞を分離する方法、分離した増殖性ヒト肝細胞を機能性ヒト肝細胞へと分化誘導する方法を提供する。またこの出願の方法は、前記の方法で取得される増殖性ヒト肝細胞と機能性肝細胞、並びにこの細胞を含む細胞キットおよびハイブリット型人工肝臓を提供する。

WO 03/080670 A1

明細書

増殖性ヒト肝細胞を認識する抗体と、増殖性ヒト肝細胞 および機能性ヒト肝細胞

5

技術分野

この出願の発明は、増殖性ヒト肝細胞を認識する抗体とヒト肝細胞に関するものである。さらに詳しくは、この出願の発明は、クローン性増殖能を有するヒト肝細胞を特異的に認識し、ヒト肝細胞集団から増殖性肝細胞を分離するのに有用なモノクローナル抗体と、この抗体の使用によって分離された増殖性ヒト肝細胞、この増殖性ヒト肝細胞を分化肝細胞に分化誘導する方法と、この方法により分化誘導された機能性ヒト肝細胞、並びにこの機能性ヒト肝細胞を備えた肝細胞キットおよび体外型人工肝臓に関するものである。

15

背景技術

肝臓は 500 種類以上もの多種多様な特異機能を有する。肝臓の主な機能として、血漿蛋白質の合成分泌、糖新生やグリコーゲン代謝による血糖調節、脂質合成、尿素合成、胆汁合成分泌、解毒などが挙げられる。

体内に取り込まれた物質の多くは肝臓で代謝される。医薬品開発の領域では、医薬品候補物質が肝臓でどのような代謝を受け、肝臓やその他の臓器や組織にどのような影響を与えるかは必須のデータである。さらに、これまで多くの化学物質が合成され環境へも放出されている。これらの物質が個々に、あるいは複合して人体にどのような影響をおよぼすかを解明することは、社会的にも非常に重要であり、このような化学物質の人体への影響評価にも肝機能に対する毒性試験が必要とされている。

30

医薬品候補物質をはじめとする化学物質の安全性試験や薬物代謝試験には、現在のところ、マウス、ラット、ウサギ、イヌ、サル等が使われている。特に医薬品開発ではヒトを対象とする第一相試験へ入る前に、動物を用いた毒性試験・安全性試験が義務づけられているが、これには多大な時間と労力を必要とし、投資額も莫大なものとなる。

しかしながら、これらの動物実験で得られるデータがそのままヒトに適応される保証はない。事実、動物実験では毒性の認められなかった物質がヒトに対して毒性を示す例は多く、また逆の場合もあり得る。したがって、これまで多くの医薬品候補物質がヒトを対象とする第一相試験に入ってから開発中止となったり、また、動物実験では毒性が強いために臨床試験に入る前に開発中止となった物質においても、実際にはヒトには毒性が認められないケースも多く存在しているものと予想される。

このことは、ヒトの肝臓における代謝機能とマウスやラットの肝臓における代謝機能の違いが起因していると考えられている。最近では、ヒト肝細胞を用いた *in vitro* 代謝試験や毒性試験が行われるようになった。ところが、移植に用いられなかった脳死患者の肝臓や腫瘍摘出などによる切除肝から得られるヒト肝細胞の量は需要をはるかに下回っている。したがって、ヒト肝細胞の増殖技術の開発は医薬品開発において必要とされている。

また、大量のヒト肝細胞の必要性は、体外型人工肝臓においても同様である。人工肝臓は、人工的に肝臓機能を代行するための医療装置であり、吸着、透析、濾過等の物理化学的原理に基づく人工的な作用と、摘出肝や肝組織の灌流による生物学的作用を組み合わせたハイブリッド型の人工肝臓の開発が精力的に進められている。この人工肝臓の開発に当たっては、物理化学的機能を向上させるための膜や回路の性能向上とともに、ヒトへの適用が可能な大量の肝細胞の供給が不可欠とされている。

しかしながら、ヒトの肝細胞については、これまで成熟個体から単離した初代

細胞を継代的に培養することは不可能であるとされてきた。すなわち、接着依存性の成熟肝細胞は、その継代操作のために培養基質から剥離する際に大きく損傷し、また培養基質に再接着させることも困難なためである。これに対し、この出願の発明者らは、ヒト肝臓から分離した正常肝細胞からクローン性増殖能を有する小型肝細胞を単離し、この小型肝細胞を初代培養し、さらにこの培養肝細胞を継代培養して肝細胞を増殖させる方法を発明し、特許を取得している（特開平 08-112092 号公報；日本特許第 3266766 号；米国特許第 6,004,810 号、特開平 10-179148 号公報；日本特許第 3211941 号、特開平 7-274951 公報；日本特許第 3157984 号、特開平 9-313172 号公報；日本特許第 3014322 号）。また、関連の論文も発表している（Chise Tateno, and Katsutoshi Yoshizato: Growth and differentiation in culture of clonogenic hepatocytes that express both phenotypes of hepatocytes and biliary epithelial cells. American Journal of Pathology 149:1593-1605, 1996. Hiroshi Hino, Chise Tateno, Hajime Sato, Chihiro Yamasaki, Shigeru Katayama, Toshihiko Kohashi, Masao Aratani, Toshimasa Asahara, Kiyohiko Dohi, and Katsutoshi Yoshizato: A long-term culture of human hepatocytes which show a high growth potential and express their differentiated phenotypes. Biochemical and Biophysical Research Communications 256: 184-191, 1999. Chise Tateno, Kaori Takai-Kajihara, Chihiro Yamasaki, Hajime Sato, and Katsutoshi Yoshizato: Heterogeneity of growth potential of adult rat hepatocytes in vitro. Hepatology 31: 65-74, 2000. Shigeru Katayama, Chise Tateno, Toshimasa Asahara, and Katsutoshi Yoshizato: Size-dependent in vivo growth potential of adult rat hepatocytes. American Journal of Pathology 158: 97-105, 2001.)。

この先願特許発明の方法は、in vitro で肝細胞を増殖させて大量のヒト肝細胞を得るための新しい手段を提供するものであるが、この方法で得られたヒト肝細胞は、長期間の継代培養中に幾つかの肝機能が低下してしまうという問題点を有していた。またこの小型肝細胞は、アルブミン発現量や、化学物質代謝酵素シトクロム P450 活性等を指標とした場合、正常肝細胞と同等の機能を有する肝細胞

(機能性肝細胞)には分化することができないという問題点を有してもいる。このため、例えば特定の肝機能を維持するための薬剤のスクリーニング系として、あるいは長期間の継代培養後も保存されている特定の機能について薬剤の毒性や薬効を試験する系としては有用であるが、ヒト肝機能代替としての肝細胞として、
5 またはハイブリット型人工肝臓の材料としては不十分な点も存在する。

また増殖能を有する小型肝細胞は、前記の先願特許発明に記載されているような遠心分離を用いた方法(低速遠心分離した上澄み中の細胞を単離する方法)の他、エルトリエーターやFACS等の細胞分画装置によっても採取することができるが、これらの手段で得られた細胞は、増殖性肝細胞だけでなく、他の細胞
10 (例えば、低速遠心による上澄みに含まれる星細胞等の非肝実質細胞)との混合物である。従って、実質的に増殖性ヒト肝細胞のみを取得することのできる手段が求められていた。

この出願の発明は、以上のとおりの事情に鑑みてなされたものであって、増殖性ヒト肝細胞を特異的に認識するモノクローナル抗体を提供することを課題としている。

またこの出願の発明は、増殖性ヒト肝細胞の分離方法と、この方法により得られる増殖性ヒト肝細胞を提供することを課題としている。
20

さらにこの出願の発明は、増殖性ヒト肝細胞を機能性ヒト肝細胞に分化誘導する方法と、この方法によって得られた機能性ヒト肝細胞、および機能性ヒト肝細胞の利用を提供することを課題としている。
25

発明の開示

この出願は、前記の課題を解決するための第1の発明として、増殖性ヒト肝細胞を特異的に認識するモノクローナル抗体を提供する。この第1発明のモノ
30

クローナル抗体の一例は、ハイブリドーマ細胞 Mouse-Mouse hybridoma K8223 (FERM BP-8334) が産生するモノクローナル抗体である。

第 2 の発明として、第 1 発明のモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ細胞を提供する。このハイブリドーマ細胞の一例は、Mouse-Mouse hybridoma K8223 (FERM BP-8334) である。

第 3 の発明として、ヒト肝細胞集団から、前記第 1 発明のモノクローナル抗体によって認識される細胞を分離することを特徴とする増殖性ヒト肝細胞の分離方法を提供する。

第 4 の発明として、前記第 3 発明の方法で分離された増殖性ヒト肝細胞を提供する。

さらにまた、第 5 の発明として、前記第 4 発明の増殖性ヒト肝細胞を分化誘導する方法であって、以下の手段：

(a) 増殖性ヒト肝細胞のスフェロイド培養；および

(b) 増殖性ヒト肝細胞への肝細胞核因子 4 (HNF4) 遺伝子導入、

の少なくとも一方を行うことを特徴とする増殖性ヒト肝細胞の分化誘導方法を提供する。

第 6 の発明として、前記第 5 発明の方法で分化誘導された機能性ヒト肝細胞を提供する。

さらに第 7 の発明として、前記第 6 発明の機能性ヒト肝細胞を含む細胞キットを提供する。

さらにまた、第 8 の発明として、前記第 6 発明の機能性ヒト肝細胞を充填したハイブリッド型人工肝臓を提供する。

なおこの発明において、「増殖性ヒト肝細胞」とは、培養条件下 (in vitro) において、単一細胞種の集団としてのコロニーを形成し、そのコロニーを増大させるように増殖するヒト肝細胞を意味する。また、その増殖は、コロニー構成細胞が単一種であるという点において「クローン性増殖」という場合もある。さらに、このような細胞は、継代培養によって細胞数をさらに増加することができる細胞である。

またこの発明において、「機能性ヒト肝細胞」とは、人体内 (in vivo) または初代培養 (in vitro) におけるヒト正常肝細胞と同程度の機能を有する細胞を意味するが、さらに具体的には、少なくとも「アルブミン発現量」および「シトクロム P450 活性」がヒト正常肝細胞と実質的に同等であることを意味する。

この発明におけるその他の用語や概念は、発明の実施形態の説明や実施例において詳しく規定する。またこの発明を実施するために使用する様々な技術は、特にその出典を明示した技術を除いては、公知の文献等に基づいて当業者であれば容易かつ確実に実施可能である。例えば、この発明の遺伝子工学および分子生物学的技術は Sambrook and Maniatis, in Molecular Cloning-A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 1989; Ausubel, F. M. et al., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, New York, N.Y., 1995 等に記載されている。

図面の簡単な説明

図 1 は、様々な年齢の患者から採取した肝細胞を培養した時の増殖曲線である。

図 2 は、モノクローナル抗体を作るために抗原として用いた培養ヒト肝細胞の位相差顕微鏡像である。

図 3 は、ハイブリドーマ K8223 培養上清の、ヒト肝組織における反応性を蛍光抗体染色により観察した像である。

図 4 は、ハイブリドーマ No. 23 培養上清の、分離直後のヒト肝細胞表面における反応性を FACS により解析した結果である。

図 5 は、ハイブリドーマ No. 23 培養上清に反応した細胞集団 (R2) と未反応の細胞集団 (R3) を分取し、培養した時の位相差顕微鏡像である。

10 図 6 は、ハイブリドーマ No. 23 培養上清の、継代培養ヒト肝細胞表面における反応性を FACS により解析した結果である。

図 7 は、単層培養およびスフェロイド培養した肝細胞それぞれの培養 1 日目 (上段) および 7 日目 (下段) の位相差顕微鏡像である。

15

図 8 は、ヒト肝臓から分離直後の肝細胞、単層培養した継代培養肝細胞、およびスフェロイド培養した肝細胞のそれぞれにおけるヒト型 P450 遺伝子または GAPDH 遺伝子発現量を示したグラフである。

20 図 9 は、単層培養およびスフェロイド培養した肝細胞それぞれのアルブミン分泌量の経時的変化を示したグラフである。

図 10 は、ヒト HNF4 遺伝子を導入した培養ヒト細胞におけるヒト型 P450 遺伝子の発現量を示したグラフである。

25

発明を実施するための最良の形態

第 1 発明のモノクローナル抗体は、コロニーを形成しながら増殖するヒト肝細胞を特異的に認識することを特徴とする。さらに詳しくは、このモノクローナル

30

抗体は、コロニーを形成しながら増殖し、かつ、機能性ヒト肝細胞へ分化可能なヒト肝細胞を特異的に認識することを特徴とする。この場合の「特異的に認識する」とは、前記のヒト肝細胞にのみ結合し、他の細胞および／または前記の特徴を有していないヒト肝細胞には結合しないことを意味する。

5

この第 1 発明のモノクローナル抗体は、この出願の第 2 発明のハイブリドーマ細胞から公知の方法で得ることができる。ハイブリドーマ細胞およびモノクローナル抗体は、公知のモノクローナル抗体作製法（「単クローン抗体」、長宗香明、寺田弘共著、廣川書店、1990 年；"Monoclonal Antibody" James W. Goding, third edition, Academic Press, 1996）に従い、例えば以下の様な手順で作製することができる。

10

1：ハイブリドーマ細胞の作製

15

継代培養したヒト正常肝細胞を含む免疫原を用いて哺乳動物を免疫し、必要に応じて適宜に追加免疫して動物を十分に感化する。次いでこの動物から抗体産生細胞（リンパ細胞または脾臓細胞）を摘出し、これとミエローマ（骨髓腫）細胞株との融合細胞を得る。そして、これらの融合細胞株から、目的とするモノクローナル抗体を産生する細胞を選択し、培養することによって、ハイブリドーマ細胞を得ることができる。以下、各工程を詳しく説明する。

20

a) 免疫原の調製

正常肝組織からコラゲナーゼで分離したヒト肝細胞を継代培養し、免疫原とする。ヒト肝細胞は、4 回以上、好ましくは 6 回以上の継代が可能な、例えば 15 歳以下のヒト肝組織から分離したものを使用することが好ましい。

25

b) 動物の免疫

30

被免疫動物としては、公知のハイブリドーマ作製法に用いられる哺乳動物を使用することができる。具体的には、たとえばマウス、ラット、ヤギ、ヒツジ、ウシ、ウマ等である。ただし、摘出した抗体産生細胞と融合させるミエローマ細胞の入手容易性等の観点からは、マウスまたはラットを被免疫動物とするのが好ま

しい。また、実際に使用するマウスおよびラットの系統は特に制限はなく、マウスの場合には、たとえば各系統 A、AKR、BALB/c、BDP、BA、CE、C3H、57BL、C57BR、C57L、DBA、FL、HTH、HT1、LP、NZB、NZW、RF、RⅢ、SJL、SWR、WB、129 等が、またラットの場合には、たとえば、Low、Lewis、

- 5 Sprague、Dawley、ACI、BN、Fischer 等を用いることができる。このうち、後述のミエローマ細胞との融合適合性を勘案すれば、マウスでは BALB/c 系統が、ラットでは low 系統が被免疫動物として特に好ましい。なお、これらマウスまたはラットの免疫時の週齢は 5～12 週齢が好ましい。

- 10 動物の免疫は、免疫原である継代ヒト肝細胞を、 $10^4 \sim 10^8$ 個程度、動物の皮内または腹腔内に投与することによって行うことができる。免疫原の投与スケジュールは被免疫動物の種類、個体差等により異なるが、一般には、抗原投与回数 1～6 回、複数回の場合は投与間隔 1～2 週間が好ましい。

c) 細胞融合

- 15 上記の投与スケジュールの最終免疫日から 1～5 日後に被免疫動物から脾臓を摘出、脾臓細胞を含む脾臓細胞またはリンパ細胞を無菌的に取り出す。これらの脾臓細胞またはリンパ細胞からの抗体産生細胞の分離は、公知の方法に従って行うことができる。

- 次いで、抗体産生細胞とミエローマ細胞とを融合する。このミエローマ細胞には特段の制限はなく、公知の細胞株から適宜に選択して用いることができる。ただし、融合細胞からハイブリドーマを選択する際の利便性を考慮して、その選択手続が確立している HGPRT (Hypoxanthine-guanine phosphoribosyl transferase) 欠損株を用いるのが好ましい。すなわち、マウス由来の X63-Ag8(X63)、NS1-Ag4/1(NS-1)、P3X63-Ag8.U1(P3U1)、X63-Ag8.653(X63.653)、SP2/0-Ag14(SP2/0)、MPC11-45.6TG1.7(45.6TG)、FO、S149/5XXO,BU.1 等、ラット由来の 210.RSY3.Ag.1.2.3(Y3)等、ヒト由来の U266AR(SKO-007)、GM1500・GTG-A12(GM1500)、UC729-6、LICR-LOW-HMy2(HMy2)、8226AR/NIP4-1(NP41)等である。
- 25

- 30 抗体産生細胞とミエローマ細胞との融合は、公知の方法に従い、細胞の生存率を極度に低下させない程度の条件下で適宜実施することができる。そのような方

法は、例えば、ポリエチレングリコール等の高濃度ポリマー溶液中で抗体産生細胞とミエローマ細胞とを混合する化学的方法、電氣的刺激を利用する物理的方法等を用いることができる。

- 5 融合細胞と非融合細胞の選択は、例えば、公知の HAT（ヒポキサンチン・アミノプテリン・チミジン）選択法により行うのが好ましい。この方法は、アミノプテリン存在下で生存し得ない HGPRT 欠損株のミエローマ細胞を用いて融合細胞を得る場合に有効である。すなわち、未融合細胞および融合細胞を HAT 培地で培養することにより、アミノプテリンに対する耐性を持ち合わせた融合細胞のみを選択的に残存させ、かつ増殖させることができる。

10

d) ハイブリドーマのスクリーニング

目的とするモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ細胞のスクリーニングは、公知の酵素免疫検定法（EIA：Enzyme Immunoassay）、放射線免疫測定法（RIA：Radio Immunoassay）、蛍光抗体法等により行うことができる。

- 15 このようなスクリーニングによって、高い増殖能を有するヒト肝細胞と特異的に結合するモノクローナル抗体をそれぞれに産生するハイブリドーマ細胞群が得られる。

20 なお、スクリーニング後のハイブリドーマ細胞は、メチルセルロース法、軟アガロース法、限界希釈法等の公知の方法によりクローニングし、抗体産生に用いる。

以上の通りの方法によって得たハイブリドーマ細胞は、液体窒素中または-80℃以下の冷凍庫中に凍結状態で保存することができる。この出願は、このようなハイブリドーマ細胞の具体例として、Mouse-Mouse hybridoma K8223（FERM BP-8334）を提供する。

25

2：モノクローナル抗体の取得および精製

上記 1 で作製したハイブリドーマ細胞を公知の方法で培養することによって、増殖性ヒト肝細胞のみと特異的に結合するモノクローナル抗体を得ることができる。

- 30 培養は、例えば、前記のクローニング法で使用した同じ組成の培地中で培養し

てもよく、あるいはモノクローナル抗体を大量に産生するためには、マウス腹腔内にハイブリドーマ細胞を注射し、腹水からモノクローナル抗体を採取してもよい。

このようにして得たモノクローナル抗体は、例えば硫酸塩析法、ゲル濾過法、
5 イオン交換クロマトグラフィー法、アフィニティークロマトグラフィー法等により精製することができる。

この出願は、ハイブリドーマ細胞の具体例として、前記のハイブリドーマ細胞
Mouse-Mouse hybridoma K8223 (FERM BP-8334) を、またモノクローナル
10 ル抗体の具体例として、ハイブリドーマ細胞 Mouse-Mouse hybridoma K8223
(FERM BP-8334) が産生するモノクローナル抗体を提供する。

第 3 発明は、増殖性ヒト肝細胞の分離方法であり、ヒト肝細胞集団から前記
第 1 発明のモノクローナル抗体によって認識される細胞を分取することを特徴
15 とする。ヒト肝細胞集団は、例えば、ヒト肝臓からコラゲナーゼ灌流法等の公知
の方法で単離され、培養条件下に置かれた初代細胞、またはこの初代細胞を 1～
8 回継代培養した継代細胞とすることができる。あるいはまた、このヒト肝細胞
集団は、この出願の発明者らによる特許発明（特開平 08-112092 号公報；日本
特許第 3266766 号；米国特許第 6,004,810 号、特開平 10-179148 号公報；日
20 本特許第 3211941 号、特開平 7-274951 公報；日本特許第 3157984 号、特開
平 9-313172 号公報；日本特許第 3014322 号）における「小型ヒト肝細胞を含
む細胞集団」であってもよい。すなわちこれらの特許発明における小型ヒト肝細胞
には、星細胞等の非実質肝細胞や、小型ヒト肝細胞の培養および継代培養のため
に共培養される Swiss 3 T3 細胞等が含まれている。第 1 発明のモノクロー
25 ナル抗体を使用することによって、このような細胞集団から、さらに効率よく増
殖性ヒト細胞を分離することができる。

増殖性ヒト肝細胞の分離は、前記のヒト肝細胞集団に、酵素、放射性同位体、
磁気ビーズまたは蛍光色素等で標識したモノクローナル抗体を接触させ、標識シ
30 グナルを発する細胞を単離することによって行うことができる。この方法では、

遠心分離や細胞分画装置等における細胞負荷がほとんどないため、ほぼ無傷の状態で増殖性ヒト肝細胞を取得することができる。なお、標識として使用する酵素は、turnover number が大であること、抗体と結合させても安定であること、基質を特異的に着色させる等の条件を満たすものであれば特段の制限はなく、通常の EIA に用いられる酵素、例えば、ペルオキシダーゼ、 β -ガラクトシダーゼ、アルカリフォスファターゼ、グルコースオキシダーゼ、アセチルコリンエステラーゼ、グルコース-6-リン酸化脱水素酵素、リンゴ酸脱水素酵素等を用いることもできる。また、酵素阻害物質や補酵素等を用いることもできる。これら酵素と抗体との結合は、マレイミド化合物等の架橋剤を用いる公知の方法によって行うことができる。基質としては、使用する酵素の種類に応じて公知の物質を使用することができる。例えば酵素としてペルオキシダーゼを使用する場合には、3,3',5,5'-テトラメチルベンジシンを、また酵素としてアルカリフォスファターゼを用いる場合には、パラニトロフェノール等を用いることができる。放射性同位体としては、 ^{125}I や ^3H 等の通常の RIA で用いられているものを使用することができる。蛍光色素としては、フルオレッセンスイソチオシアネート (FITC) やテトラメチルローダミンイソチオシアネート (TRITC) 等の通常の蛍光抗体法に用いられるものを使用することができる。また、標識シグナルの検出は、酵素を用いる場合には酵素作用によって分解して発色する基質を加え、基質の分解量を光学的に測定することによって酵素活性を求め、これを結合抗体量に換算し、標準値との比較から抗体量が算出される。放射生同位体を用いる場合には、放射性同位体の発する放射線量をシンチレーションカウンター等により測定する。また、蛍光色素を用いる場合には、蛍光顕微鏡を組み合わせた測定装置によって蛍光量を測定すればよい。

25 以上の方法によって、この出願の第 4 発明の「増殖性ヒト肝細胞」が得られる。この増殖性ヒト肝細胞は、培養条件下においてコロニーを形成して活発に増殖するが、さらに、機能性ヒト肝細胞への分化能を有する細胞でもある。このような機能性ヒト肝細胞は、第 5 発明の方法によって増殖性ヒト肝細胞から分化誘導することができる。なお、増殖性ヒト肝細胞は、実施例 1 のモノクローナ
30 ル抗体作製の際の免疫原として使用したヒト肝細胞の取得方法によっても得るこ

とができるが、この実施例 1 の方法の場合には、非増殖性細胞も含まれている可能性がある。この発明のモノクローナル抗体を用いる方法は、実質的に増殖性ヒト肝細胞のみを分離することができる点において優れた方法である。

- 5 第 5 発明の方法は、以下の手段(a)または(b)、もしくは(a)および(b)を行うことを特徴としている。

(a)：増殖性ヒト肝細胞のスフェロイド培養

- 「スフェロイド」とは、細胞が数百個集合して組織構造を形成する細胞の集合
10 体を意味する。具体的には、細胞を以下に示す方法で 3 次元的な細胞集団とし、これを動物細胞培地で培養する。スフェロイドを得る公知の方法としては、マトリゲル (MATRIGEL™ Matrix、ベクトン・ディッキンソン)、ポジティブチャージの培養器 (プライマリア、ベクトン・ディッキンソン)、U 底培養器 (スフェロイド・MS? 0096S、スミロン) 上での培養や、ローラーボトルでの旋
15 回培養等が挙げられる。また、培養は 6~15 日間程度行えばよい。

(b)：増殖性ヒト肝細胞への肝細胞核因子 4 (HNF4) 遺伝子の導入

- 肝細胞核因子 4 (hepatocyte nuclear factor 4: HNF4) は、肝細胞において特異的な機能を発現する遺伝子の転写に関するタンパク質であり (例えば、
20 Bell, G.I. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 88 (4), 1484-1488, 1991)、ヒト HNF4 α の cDNA 配列が公知である (例えば、GenBank/NM_000457)。また HNF4b (GenBank/X87871)、HNF4c (GenBank/X87872) の cDNA 配列も公知である。さらに、マウス HNF4 cDNA (GenBank/NM_008261)、ラット HNF4 cDNA (GenBank/X57133) 等も知られている。従って、これら
25 の公知の HNF4 cDNA を真核細胞発現ベクターに組換え、この発現ベクターを、例えば電気穿孔法、リン酸カルシウム法、リポソーム法、DEAE デキストラン法等の公知の方法を増殖性ヒト肝細胞に導入することによって HNF4 遺伝子を導入することができる。あるいは例えば生体認識分子を提示した中空ナノ粒子、レトロウイルス、レンチウイルス、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス等を用
30 いる遺伝子治療法 (ex vivo 法) に準じた方法によっても HNF4 遺伝子を導入す

ることができる。また、HNF4 遺伝子 cDNA は、それらの既知配列に基づいて作製したプローブ DNA を用いて、ヒト等の cDNA ライブラリーをスクリーニングすることによって取得することができる。得られた cDNA は、例えば、PCR (Polymerase Chain Reaction) 法、NASBN (Nucleic acid sequence based amplification) 法、TMA (Transcription-mediated amplification) 法および SDA (Strand Displacement Amplification) 法などの通常行われる遺伝子増幅法により増幅し、使用することができる。また、既知配列に基づいて作成したプライマーセットを用い、哺乳動物細胞から単離した mRNA を鋳型とする RT-PCR (Reverse Transcriptase-PCR) 法によっても目的とする十分量の cDNA を得ることができる。

以上の分化誘導方法によって、後記の実施例に示したように、人体内または初代培養におけるヒト正常肝細胞と同程度の機能性、具体的には十分量のアルブミン発現およびシトクロム P450 活性を有する第 6 発明の機能性肝細胞が得られる。なお、以上の分化誘導による機能性ヒト肝細胞は、例えば後記の実施例 1 において免疫原のヒト肝細胞を調製したのと同様の方法で得られる継代培養細胞（コロニーを形成して継代培養可能な肝細胞）を用いても実施することができる。ただし、このような継代培養細胞には、非増殖性細胞も含まれている可能性がある。

20

以上の方法によって得られた第 6 発明の機能性ヒト肝細胞を用いることによって、薬物代謝試験や安全性試験などに用いることができるヒト肝細胞キット（第 7 発明）や、ハイブリッド型人工肝臓（第 8 発明）が提供される。さらに、ハイブリッド型人工肝臓に使用するモジュール（ヒト肝細胞を充填したモジュール）を使用して、ヒト肝細胞が生産する有用物質を回収することできる。

25

肝細胞キットは、細胞の種類や用途に応じて各種のものが公知であり、当業者であれば、第 6 発明のヒト肝細胞と公知の細胞キットの構成を採用することによって、第 7 発明の細胞キットを容易に作製することができる。また、モジュールやハイブリッド型人工臓器の構成も公知であり、当業者であれば第 8 発明

30

の人工肝臓等を容易に作製することができる。

実施例

5

以下、実施例を示してこの出願の発明についてさらに詳細かつ具体的に説明するが、この出願の発明は以下の例によって限定されるものではない。

10

実施例 1

ヒト増殖性肝細胞を認識するモノクローナル抗体の作製

1. ヒト肝細胞の培養

ヒト肝臓組織よりコラゲナーゼ灌流法により、細胞分散液を得た。細胞分散液
15 を低速遠心分離（50g、2 分）し、その沈殿画分を牛胎児血清、ヒト血清、EGF、
ニコチンアミド、活性持続型ビタミン C を添加した Dulbecco's modified
Eagle's medium (DMEM) を用い、マイトマイシン C 処理した Swiss 3T3 細胞
と混合培養した。Swiss 3T3 細胞は 10 日毎に添加した。培養 7 日目頃よりヒ
ト肝細胞のコロニーが観察された。コンフルエントに増殖した肝細胞を
20 EDTA/Trypsin を用いて継代した。継代は、子供の肝細胞では 6-9 回継代でき、
60 才以上の患者の肝細胞は 3-4 回しか継代できなかった（図 1）。もっとも高
い増殖能を示した子供（12 才）の肝細胞を抗原として用いた（図 2）。

2. 動物の免疫

25 上記方法により、3-5 回継代培養した子供（12 才）の肝細胞を培養皿上で増
やした。コンフルエントに増殖した細胞（約 1×10^7 個）を、PBS（リン酸緩衝
塩類溶液）で洗浄した後、PBS を取り除き、セルスクレーパーで掻き取って回
収し、PBS 約 1ml に懸濁した。これを 6 週齢の Balb/c マウスの腹腔内に投与
した。さらに 20 日後または 30 日後に、同様の方法で免疫を行った。

30

3. 細胞融合

2 回の免疫後、抗体価の上昇がみられたため、3 回目の免疫 (boost) の 72 時間後、1 匹の免疫動物より脾臓を摘出、脾臓細胞を採取した。この脾臓細胞とマウスミエローマ細胞 (細胞名 NS-1) を細胞融合し、96-well plate に 372 well 播種、培養した。

4. ハイブリドーマのスクリーニング

1 次スクリーニング (ELISA、組織染色) :

得られた融合細胞の培養上清の抗原に対する反応性を ELISA により測定した。測定は以下の方法により実施した。抗原として用いた継代培養肝細胞を 96-well plate に播種し、培養後 PBS で洗浄、乾燥させ -80℃ で保存しておいたものに、培養上清を反応させた。次に酵素標識の抗マウス IgG または抗マウス IgM 抗体を反応させ、基質を加えて発色させ、その吸光度を測定した。その結果、融合細胞 372 サンプルの吸光度の平均は 0.149 (SD: 0.099) で、このうち吸光度 0.20 以上 (81 サンプル、約 20%) のサンプルを陽性とした。また目視において、吸光度 0.15 以上でも発色が確認されたことから、0.15~0.20 のサンプル (46 サンプル) については、組織染色を行い反応性を確認した。その中から、興味深い染色パターンを示した 13 サンプルについてのみ陽性サンプルとした。選択した陽性サンプル、94 サンプルをスケールアップしてさらに培養し、培養上清を回収後、細胞を凍結保存した。

5. 2 次スクリーニング (ELISA、組織染色) :

1 次スクリーニングで選んだ 94 サンプルから、スケールアップ後の培養上清の抗原に対する反応性を 1 次スクリーニングと同様の ELISA により測定し、陽性サンプル、88 サンプルを選んだ。さらに、これらのサンプルの、組織における反応性を組織染色により調べた。そのなかから、肝細胞の細胞膜や、門脈域の肝細胞に特異的に反応するハイブリドーマを含むサンプル、または、そこからクローニングによって得られたクローンの培養上清について、分離直後のヒト肝細胞への反応性を調べた。

組織において門脈域の肝細胞膜が染まるハイブリドーマ培養上清 No. 23 について、分離直後の肝細胞表面における反応性を、FACS (Fluorescence activated cell sorting) を用いて解析した。成人男性 (46 才および 49 才) の肝臓からコラゲナーゼ灌流、低速遠心により得られた細胞を、このサンプルの培養上清で 4℃、30 分処理し、次に FITC 標識した抗マウス IgG 抗体を 4℃、30 分処理することにより、FACS での検出を可能にした。その結果、肝細胞集団の一部 (1~2%) の細胞がこのサンプルに反応した (図 4)。そこで、これらの細胞集団を R2、反応しなかった細胞集団を R3 として分取し、培養した。また分取前の肝細胞も同様に培養した。その結果、分取前の肝細胞では、前述したように、培養 7 日目頃より、コロニー形成が観察された。一方、R3 画分においては、コロニーを形成する細胞は観察されなかったが、No. 23 に反応した R2 画分において、多くのコロニーが観察された (図 5)。また、継代培養ヒト肝細胞への反応性を FACS により調べたところ、約 80% の細胞が陽性であった (図 6)。すなわち、継代培養ヒト肝細胞のうち培養過程で分化した細胞は認識せず、増殖性肝細胞のみを認識していると考えられた。このことから、No. 23 には、コロニーを形成する細胞を特異的に認識するハイブリドーマが含まれている可能性が示唆された。No.23 サンプルからクローニングにより得られたクローンについても分離直後の肝細胞表面における反応性を FACS を用いて解析した。その結果、同様の反応性を示すクローンが 3 クローン得られた。これらの中から、1 クローン (Mouse-Mouse hybridoma K8223) を 2002 年 3 月 6 日付で独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センターに特許生物として寄託し (受託番号 FERM P-18752)、さらに 2003 年 3 月 20 日付で国際寄託した (受託番号 FERM BP-8334)。

25 6. モノクローナル抗体の作成

前記のハイブリドーマ (K8223 株) 細胞を培養することによって、さらに、マウス腹腔内にハイブリドーマ細胞を注射し、腹水からモノクローナル抗体を採取することにより、増殖性ヒト肝細胞と特異的に結合するモノクローナル抗体を得た。

実施例 2

増殖性ヒト肝細胞の分離

5 実施例 1 で得たモノクローナル抗体を用いて、コラゲナーゼ灌流法によりヒト肝臓組織より単離したヒト肝細胞集団から、増殖性ヒト肝細胞を分離した。具体的には、ヒト肝臓組織からコラゲナーゼ灌流、低速遠心により得られた細胞を、実施例 1 で得たモノクローナル抗体で 4℃、30 分処理し、次に FITC 標識した抗マウス IgG 抗体を 4℃、30 分処理し、反応を FACS で検出した。この抗体に
10 反応した細胞集団を R2、反応しなかった細胞集団を R3 として分取し、実施例 1.1 と同様の方法で培養した。また分取前の肝細胞も同様に培養した。その結果、分取前の肝細胞では、培養 7 日目頃より、コロニー形成が観察されたがコロニーを形成しない肝細胞も観察された。一方、R3 画分においては、コロニーを形成する細胞は観察されなかったが、このモノクローナル抗体に反応した R2 画分
15 において、多くのコロニーが観察された。以上の結果から、この発明の方法を用いることにより、分離肝細胞集団から増殖性肝細胞を効率よく単離することが可能であることが確認された。

20

実施例 3

スフェロイド形成による増殖性ヒト肝細胞の分化誘導

1. 肝細胞のスフェロイド形成

実施例 2 で得た増殖性ヒト肝細胞を、マトリゲル (MATRIGEL™ Matrix、ベ
25 クトン・ディッキンソン) 上に 1cm² 当たり 1×10⁵ 個播種し、牛胎児血清、EGF、活性持続型ビタミン C を添加した DMEM 培地で培養した。肝細胞は、培養 1 日目にはマトリゲル上でスフェロイドを形成した (図 7 上段)。

2. ヒト型 P450 遺伝子発現の解析

30 培養ヒト肝細胞をマトリゲル上に播種後、7 日目 (図 7 下段) にスフェロイド

を回収した。このスフェロイドの肝細胞から total RNA を抽出し、逆転写反応により cDNA を合成した。6 種類のヒト型 P450 分子種 (CYP1A1、1A2、2C9、2C19、2D6、3A4) のそれぞれの遺伝子 cDNA に対するプライマーを合成し、PRISM 7700 Sequence Detector (ABI PRISM™ 社) を用いて、それぞれの mRNA 発現量を定量した。また、ヒト肝臓から分離した直後の肝細胞および単層培養した増殖性ヒト肝細胞も同様にして P450 遺伝子発現を定量した。

その結果、スフェロイド培養した肝細胞は、単層培養した肝細胞に比較して、各種ヒト型 P450 の遺伝子発現が高いことが確認された。また一部のヒト型 P450 遺伝子は、分離直後の正常ヒト肝細胞と同程度の P450 遺伝子発現を示した (図 8)。

3. アルブミン分泌量の解析

スフェロイド培養した肝細胞および単層培養した肝細胞のそれぞれの培養上清を 3 日毎に回収し、培地中のヒトアルブミン濃度を Quantitative ELISA immunoassay (Bethyl Laboratories Inc.) を用いて測定した。

その結果、単層培養した肝細胞に比較して、スフェロイド培養した肝細胞は、培養 6 日目以降に高いアルブミン分泌量を示した (図 9)。

4. P450 酵素活性の解析

スフェロイド培養から 22 日目にリドカイン塩酸 ($500 \mu\text{g/ml}$) を培地に添加し、24 時間インキュベートした。培地を回収し、培地中のリドカイン代謝産物である MEGX 量を HPLC により測定した。単層培養した肝細胞についても同様の測定を行った。

その結果、単層培養した肝細胞では培地中には MEGX は検出されなかったが、スフェロイド培養した肝細胞の培地中には MEGX が検出された ($8.3 \mu\text{g/ml/24 時間}$ 、 $1.7 \mu\text{g}/10^5 \text{ cell/24 時間}$)。この結果から、スフェロイド培養した肝細胞は、P450 酵素活性 (化学物質代謝酵素活性) を有していることが確認された。

実施例 4

HNF4 遺伝子導入による増殖性ヒト肝細胞の分化誘導

1. 遺伝子導入

- 5 実施例 2 で得た増殖性ヒト肝細胞に、ヒト HNF4 α cDNA (GenBank/X87870) をアデノウイルスベクター (Q・BIO gene 社) を介して培養 1 日目に Multiplicity of infection (MOI) 0、1、5、10、20、50、100 の割合で感染させた。

10 2. ヒト型 P450 遺伝子発現の解析

アデノウイルスベクター感染後 7 日目の細胞を回収し、実施例 3-2 と同様にして各種ヒト型 P450 遺伝子の発現量を定量した。

その結果、感染量依存的にヒト型 P450 遺伝子の発現量増加が認められた (図 10)。

15

産業上の利用可能性

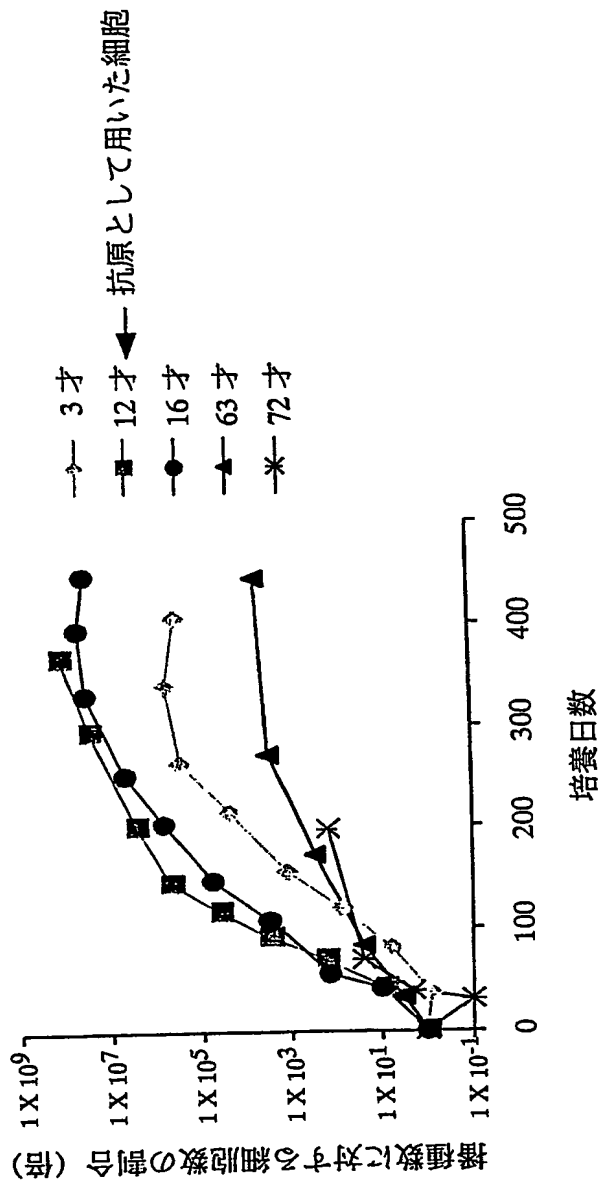
- 以上詳しく説明したとおり、この出願の発明によって、増殖性を有するヒト肝
20 細胞を特異的に認識するモノクローナル抗体と、この抗体の使用によって分離される増殖性ヒト肝細胞、この細胞を分化誘導することによって得られる機能性ヒト肝細胞が提供される。

請求の範囲

1. 増殖性ヒト肝細胞を特異的に認識するモノクローナル抗体。
- 5 2. ハイブリドーマ細胞 Mouse-Mouse hybridoma K8223 (FERM BP-8334) が産生する請求項 1 のモノクローナル抗体。
3. 請求項 1 のモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ細胞。
- 10 4. Mouse-Mouse hybridoma K8223 (FERM BP-8334) である請求項 3 のハイブリドーマ細胞。
5. ヒト肝細胞集団から、請求項 1 または 2 のモノクローナル抗体によって認識される細胞を分離することを特徴とする増殖性ヒト肝細胞の分離方法。
- 15 6. 請求項 5 の方法で分離された増殖性ヒト肝細胞。
7. 請求項 6 の増殖性ヒト肝細胞を分化誘導する方法であって、以下の手段：
 - (a) 増殖性ヒト肝細胞のスフェロイド培養；および
 - 20 (b) 増殖性ヒト肝細胞への肝細胞核因子 4 (HNF4) 遺伝子導入、
の少なくとも一方を行うことを特徴とする増殖性ヒト肝細胞の分化誘導方法。
8. 請求項 7 の方法で分化誘導された機能性ヒト肝細胞。
- 25 9. 請求項 8 の機能性ヒト肝細胞を含む細胞キット。
10. 請求項 9 の機能性ヒト肝細胞を充填したハイブリッド型人工肝臓。

1/10

図 1

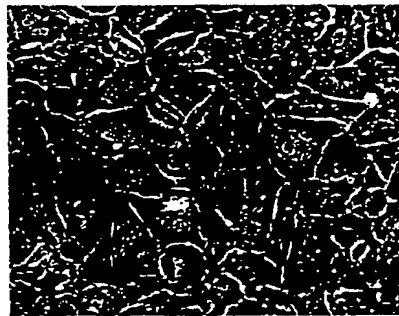


2/10

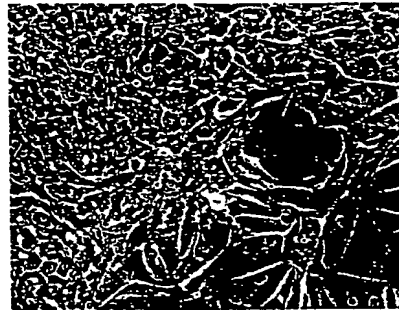
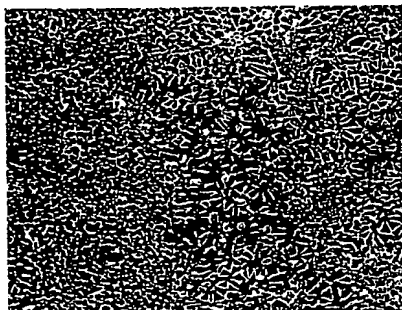
図 2

モノクローナル抗体を作るために抗原としたヒト肝細胞（12才）
初代培養

30日目



43日目



継代培養（3回）→マウス免疫

33日目



Bar, 100μm

BEST AVAILABLE COPY

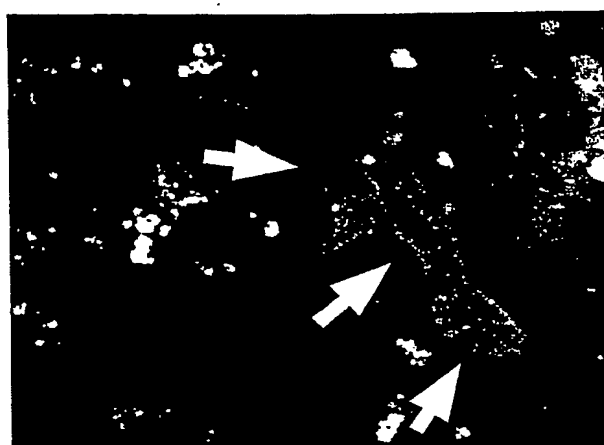
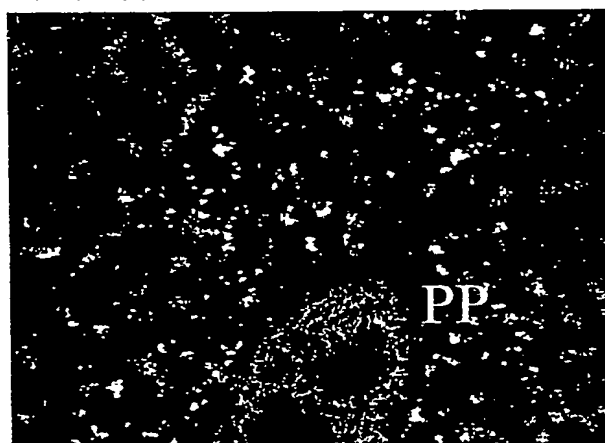
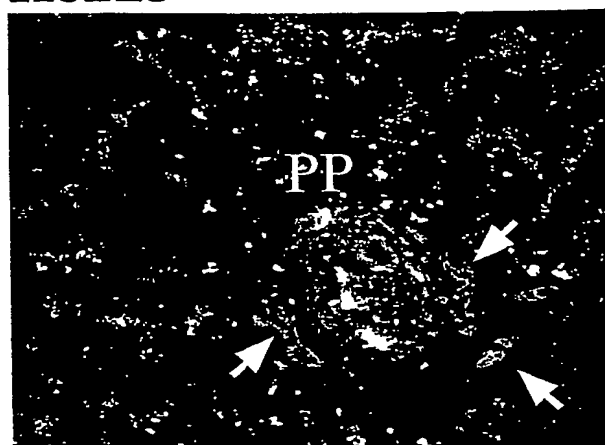
3/10

図 3

ヒト組織 (62才)
ハイブリドーマ培養上清 (K8223)

K8223

1次抗体なし



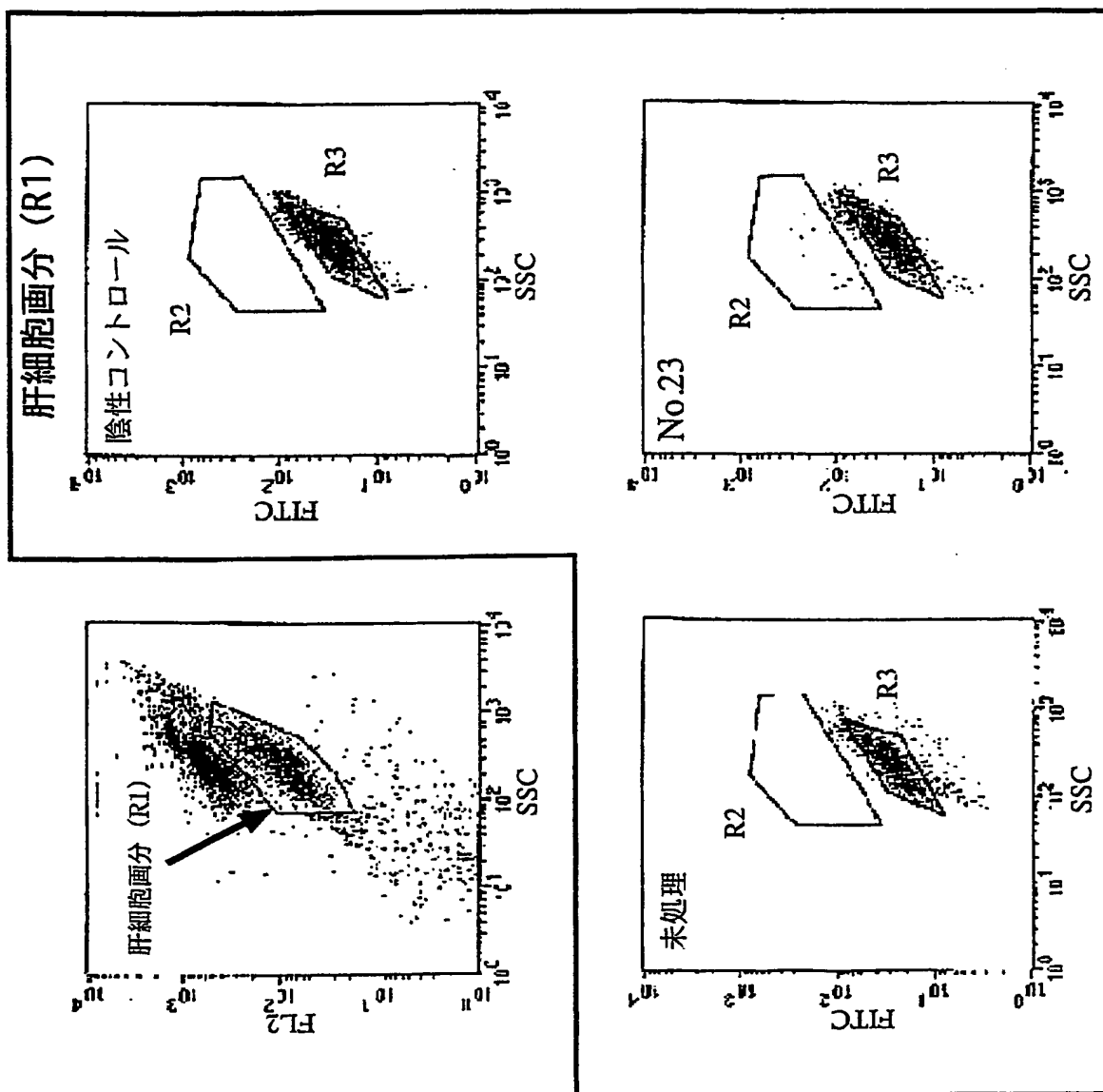
Bar, 50 μ m

PP : 門脈域

BEST AVAILABLE COPY

4/10

図 4



5/10

図 5

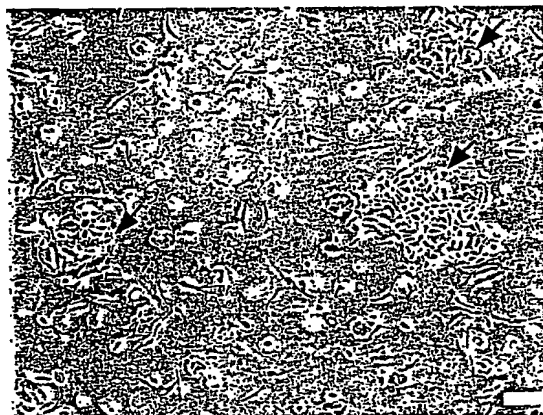
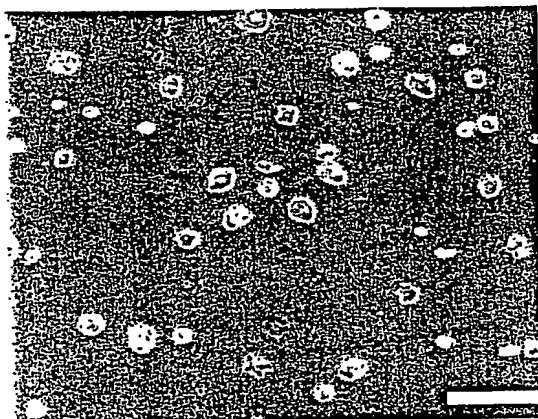
ハイブリドーマ培養上清 : No.23

単離ヒト肝細胞 (49才)

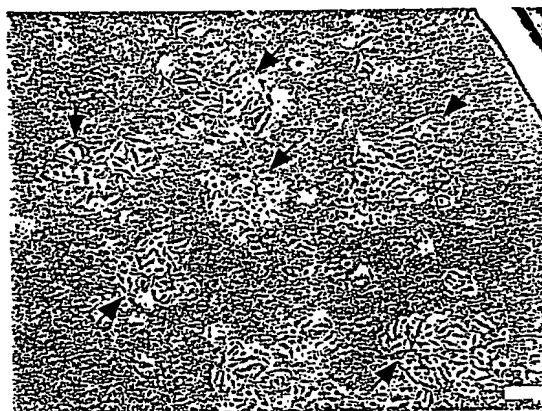
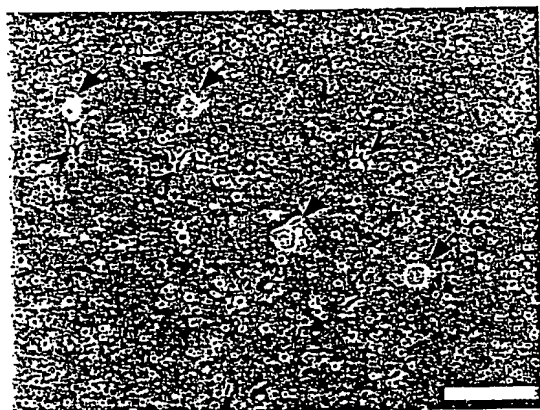
培養1日目

培養8日目

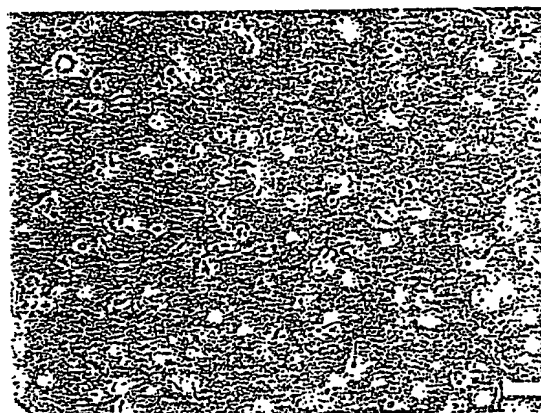
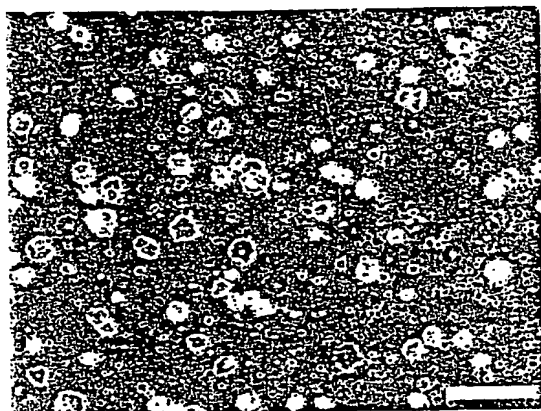
ソート前



R2 画分



R3 画分



Bar, 100 μ m

6/10

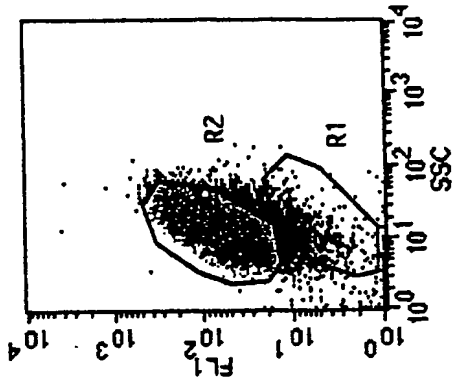
図 6

培養ヒト肝細胞 (12才、男児、継代回数 5)

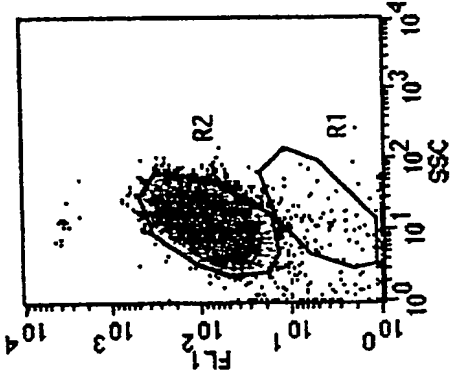
No. 23 (IgG)

ポジティブコントロール
(免疫マウス血清)

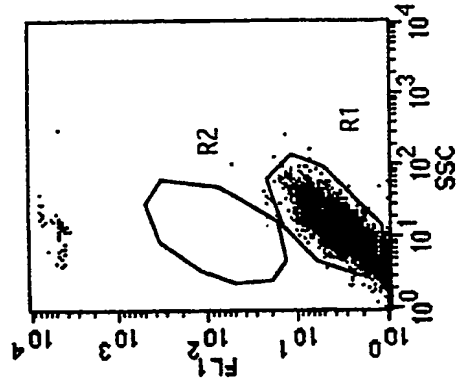
ネガティブコントロール



Region	Events	% Gated
R1	694	6.94
R2	7921	79.21



Region	Events	% Gated
R1	75	0.75
R2	9415	94.15

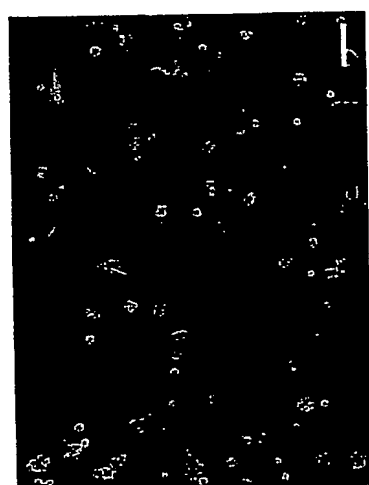
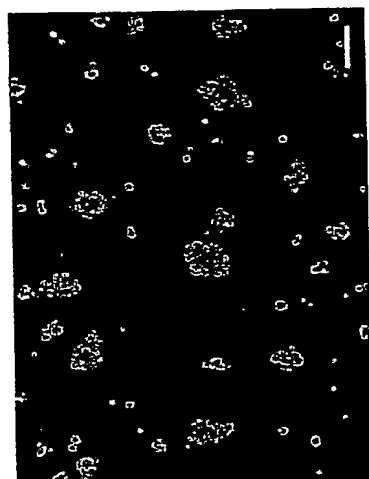
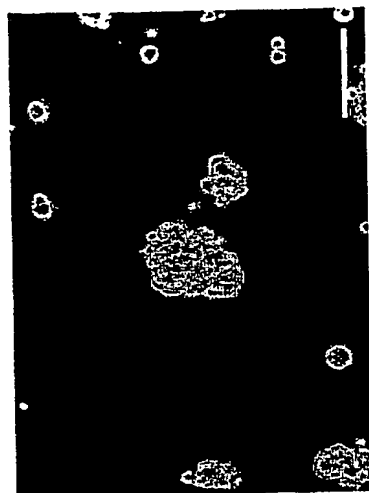


7/10

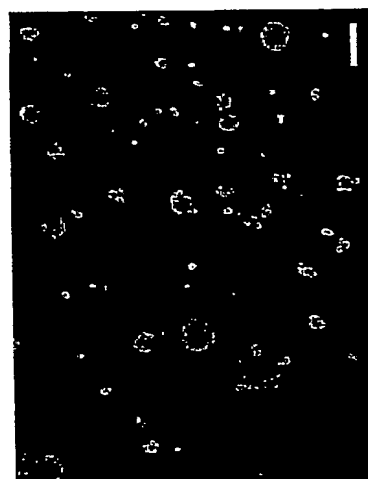
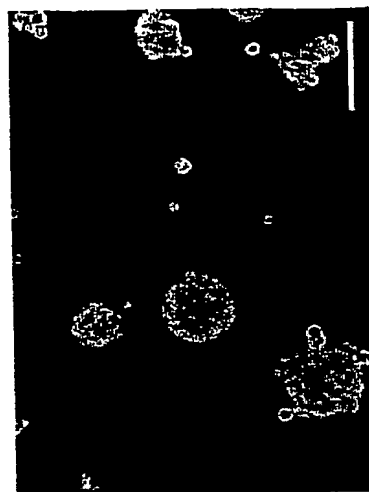
図 7

マトリゲル上でのスフェロイド形成

単層培養



培養1日目

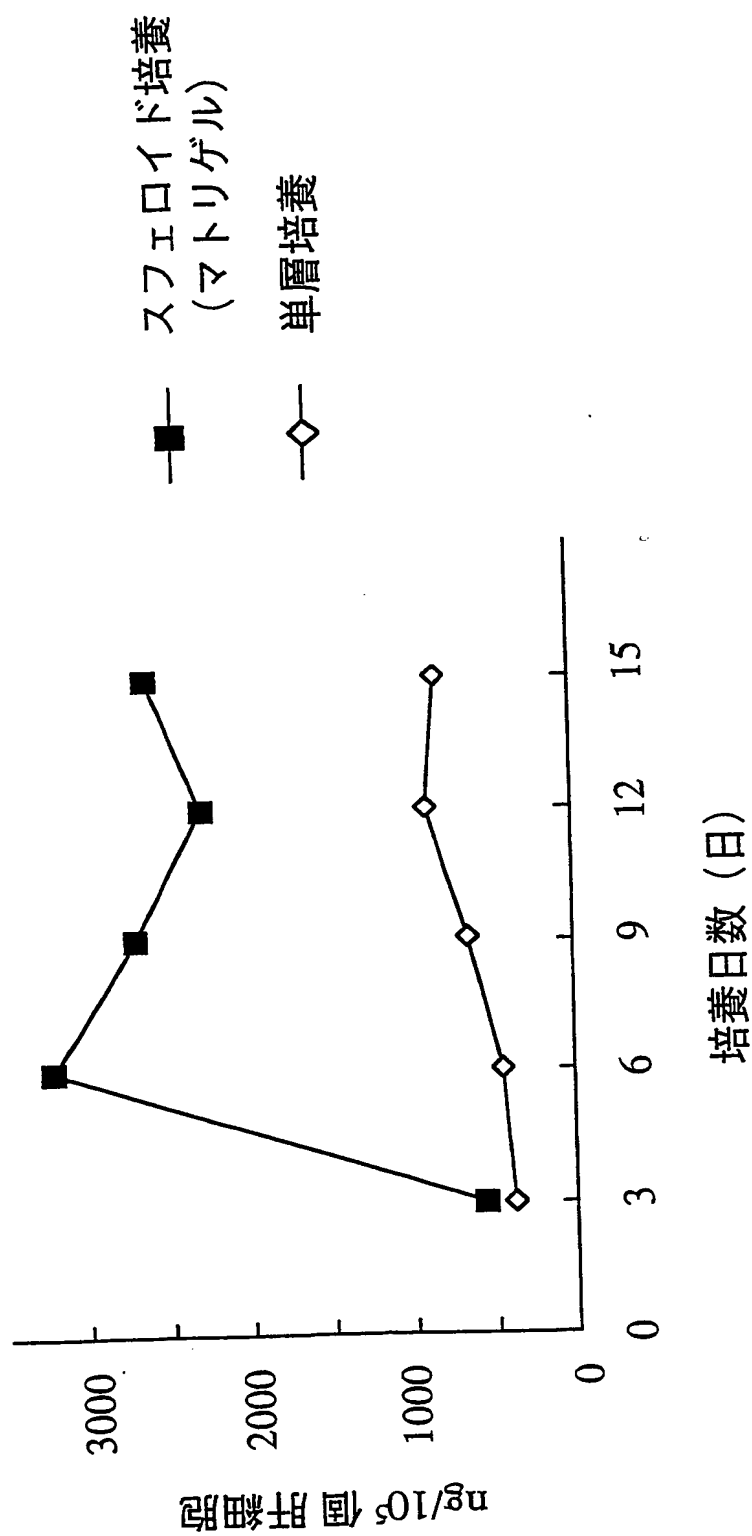


培養7日目

100 μ m

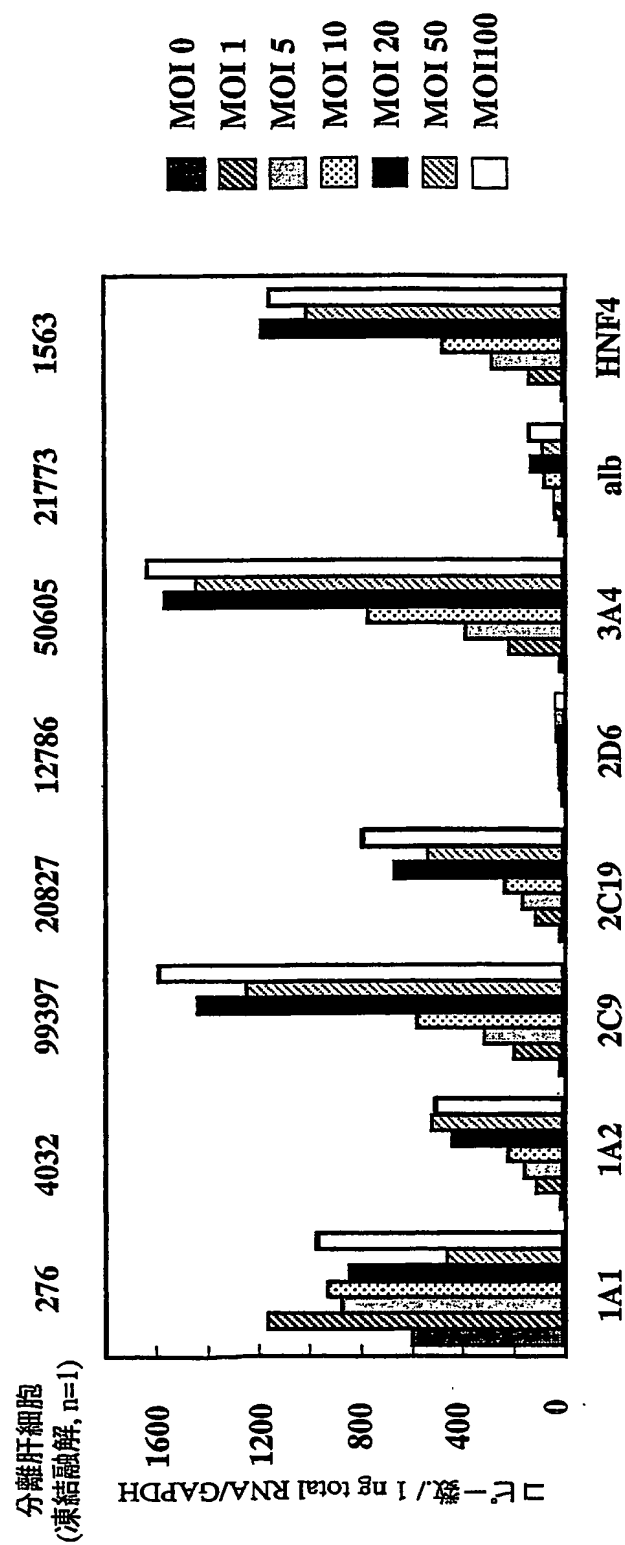
9/10

図 9



10/10

图 10



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/03624

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ C07K16/18, C12P21/08, C12N5/08, C12N5/18, C12N15/09,
A61L27/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ C07K16/18, C12P21/08, C12N5/08, C12N5/18, C12N15/09,
A61L27/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG), JSTPlus (JOIS), MEDLINE (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
<u>X</u> Y	WO 00/03001 A (Rhode Island Hospital), 20 January, 2000 (20.01.00), & EP 1097193 A1 & US 6129911 A & JP 2002-520015 A	<u>1-6, 8-10</u> 7-10
<u>X</u> Y	WO 00/43498 A1 (Univ. of North Carolina), 27 July, 2000 (27.07.00), & EP 1147179 A2 & US 2002/0182188 A1 & JP 2002-534974 A	<u>1-6, 8-10</u> 7-10
X	JP 61-189299 A (Nisshin Flour Milling Co.), 22 August, 1986 (22.08.86), (Family: none)	1-4
X	EP 682106 A2 (Research Development Corp. of Japan), 07 May, 1996 (07.05.96), & US 6004810 A & JP 8-112092 A	5, 6

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"I" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier document but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search 06 May, 2003 (06.05.03)	Date of mailing of the international search report 24 June, 2003 (24.06.03)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/03624

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	Jover, R. et al., Cytochrome P450 regulation by hepatocyte nuclear factor 4 in human hepatocytes: a study using adenovirus-mediated antisense targeting., Hepatology, Vol.33, No.3, pages 668 to 675, (2001)	7-10
Y	Stroup, D. et al., HNF4 and COUP-TFII interact to modulate transcription of the cholesterol 7alpha-hydroxylase gene (CYP7A1)., J.Lipid Res., Vol.41, No.1, pages 1 to 11, (2000)	7-10
Y	Harish, S. et al., Transcriptional activation by hepatocyte nuclear factor-4 in a cell-free system derived from rat liver nuclei., Nucleic Acids Res., Vol.29, No.5, pages 1047 to 1053, (2001)	7-10

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/03624

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

As reported in the following documents 1 and 2, there had been publicly known prior to the application of the present case a technique of obtaining human liver stem cells with the use of an antibody undergoing an immune reaction with an antigen specifically occurring in human liver stem cells (human liver precursor cells). Therefore, it cannot be regarded as a special technical feature in the meaning as defined in PCT Rule 13.2.

Thus, the group of inventions relating to the separation of proliferative human liver cells as set forth in claims 1 to 6 and the group of inventions relating to the differentiation of proliferative human liver cells as set forth in claims 7 to 10 are not considered as (continued to extra sheet)

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☒ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/03624

Continuation of Box No.II of continuation of first sheet(1)

relating to a group of inventions so linked as to form a single general inventive concept. Therefore, it is recognized that the claims of the present case have 2 groups of inventions.

Document 1: WO 00/03001 A1 (Rhode Island Hospital) 2000.01.20

Document 2: WO 00/43498 A1 (Univ. of North Carolina) 2000.07.27

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ C07K16/18、C12P21/08、C12N5/08、C12N5/18、C12N15/09、A61L27/00

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ C07K16/18、C12P21/08、C12N5/08、C12N5/18、C12N15/09、A61L27/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

WPI (DIALOG)、BIOSIS (DIALOG)、JSTPlus (JOIS)、MEDLINE (STN)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
<u>X</u> Y	WO 00/03001 A1 (Rhode Island Hospital) 2000.01.20 & EP1097193 A1 & US 6129911 A & JP 2002-520015 A	<u>1-6, 8-10</u> 7-10
<u>X</u> Y	WO 00/43498 A1 (Univ. of North Carolina) 2000.07.27 & EP1147179 A2 & US 2002/0182188 A1 & JP 2002-534974 A	<u>1-6, 8-10</u> 7-10
X	JP 61-189299 A (Nisshin Flour Milling Co.) 1986.08.22 (ファミリーなし)	1-4
X	EP 682106 A2 (新技術事業団) 1996.05.07	5, 6

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

06.05.03

国際調査報告の発送日

24.06.03

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

田村 明 照



4B

8412

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

C (続き). 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
	& US 6004810 A & JP 8-112092 A	
Y	Jover, R. et al., Cytochrome P450 regulation by hepatocyte nuclear factor 4 in human hepatocytes: a study using adenovirus-mediated antisense targeting. Hepatology, Vol. 33, No. 3, pp. 668-675 (2001)	7-10
Y	Stroup, D. et al., HNF4 and COUP-TFII interact to modulate transcription of the cholesterol 7alpha-hydroxylase gene (CYP7A1). J. Lipid Res., Vol. 41, No. 1, pp. 1-11 (2000)	7-10
Y	Harish, S. et al., Transcriptional activation by hepatocyte nuclear factor-4 in a cell-free system derived from rat liver nuclei. Nucleic Acids Res., Vol. 29, No. 5, pp. 1047-1053 (2001)	7-10

第Ⅰ欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)

法第8条第3項 (PCT17条(2)(a)) の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☐ 請求の範囲 _____ は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、
2. ☐ 請求の範囲 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☐ 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第Ⅱ欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるところの国際調査機関は認めた。

下記文献1、2にも記載されているように、ヒト肝臓幹細胞(ヒト肝前駆細胞)に特異的に存在する抗原に免疫反応する抗体を用いて、ヒト肝幹細胞を取得する技術は出願前公知であるから、PCT規則13.2における特別な技術的特徴であるとはいえない。

したがって、請求の範囲1-6に記載された増殖性ヒト肝細胞の分離に関連する発明群と請求の範囲7-10に記載された増殖性ヒト肝細胞の分化に関連する発明群とは、単一の一般的発明概念を形成するように連関している一群の発明であるとはいえず、本願の請求の範囲には2個の発明が記載されているものと認められる。

文献1: WO 00/03001 A1 (Rhode Island Hospital) 2000.01.20

文献2: WO 00/43498 A1 (Univ. of North Carolina) 2000.07.27

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☒ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。